LC/イオントラップ MS および LC/飛行時間型 MS による オリーブ油中テルブチラジンの分析

アプリケーション

食品安全性

著者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
University of Almería,
04120 Almería, Spain

要旨

このアプリケーションノートは、オリーブ油中に含まれるテルブチラジンの同定と定量を行うための液体クロマトグラフィー/イオントラップ型マススペクトロメトリー (LC/ITMS) および液体クロマトグラフィー/飛行時間型マススペクトロメトリー(LC/TOFMS) の使用について記したものです。このメソッドには、あらかじめ液液抽出を行った後に、アミノプロピル化学結合型シリカを吸着剤として使用するマトリックス固相分散(MSPD) を行うサンプル処理ステップが含まれています。最終クリーンアップでは、アセトニトリルを溶離液として Florisil を使用します。イオントラップによる分析は、特徴的な的解裂イオンである *m/z*=174 をモニタリングする MS/MS モードで行いました。LC/TOFMS による同定は、プロトン化分子([M+H]$^+$ *m/z* 230) の精密質量(およびその後計算される実験式) を、解裂イオンの精密質量およびテルブチラジン内に存在する特性的な塩素同位体クラスターとともに使用して行いました。このときに得られた一般的な精度は、常時 2 ppm 以内でした。このメソッドの感度、直線性、正確さ、精度、マトリックス効果、および検出限界についても検討を行い、オリーブ油内テルブチラジンのルーチン定量分析としての LC/TOFMS および LC/ITMS の可能性を支持する結果となりました。

はじめに

オリーブ油は、地中海周辺の国々において最も使用される食製品の 1 つです。オリーブ油の健康に対する有用な効果により、オリーブ油の需要は世界中で急速に高まっています。“バージン”オリーブ油は、オリーブの木 (*Olea Europaea*) の果実のみから、オリーブ油を変質させるようなどんな処理も一切行わず、機械的および物理的なプロセスにより得られます。地中海周辺の国々(ギリシャ、スペイン、イタリア) のオリーブ農園において最も一般的に使用される農薬の種類は、除草剤と殺虫剤です。除草剤は土壌に撒布されますが、一部の残留物質が収穫期まで残り、土壌から吸収されてオリーブの汚染を引き起こします。これにより、オリーブ油内にこうした農薬物質が微量存在する可能性があります。そのため、EU、さらには国連の食糧農業機関(FAO) のコーデックス委員会(国際食品規格委員会) により、オリーブおよびオリーブ油内の残留農薬物質の最大値が設定されてきました。現在、さまざまなオリーブ油残留農薬に関する規制が改訂されながら施行されていおり、さらに、オリーブ油商品での最大残留限界(MRL)に関する新たなより厳しい規制が制定されています[1]。こうした動きにより、試料処理後に得られる抽出物の脂肪含有量が高いことによりマトリックスが複雑であるオリーブ油などの食品試料において、その規制要件を満たす感度と選択性を提供すべく、より強力な分析手法の開発が行われています。

オリーブ油内に残留する農薬物質の測定について、さまざまなクリーンアップ技術を駆使した多成分一斉処理法、および検出方法が数多く報告されています。最も共通に用いられる方法としては、包括的なクリーンアップステップの後に行う GC を基にしています。この包括的なクリーンアップステップとしては多くの場合、トリグリセリドなどの油の主成分である高分子量の脂肪成分から低分子量の農薬を分離する液液分配または GPC のことです。GC による農薬の測定に用いる油試料の処理では、クロマトグラフシステムを測定可能な状態に保つため、試料から高分子量の脂肪を完全に除去することが必要です。最近では、MSPD 法の後にイオントラップ型 MS を用いた GC/MS 法を行うことによるトリアジンおよび有機燐系農薬の測定に用いる多成分一斉分析法が報告されています[4]。このノートでは、オリーブ油内で最も多く検出される農薬の 1 つであるテルブチラジンの同定に用いる LC/TOFMS 法および LC/ITMS 法の可能性についてさらに検討します。

実験方法

オリーブ油の抽出

MSPD は、有機溶媒を用いて事前的な液液抽出を行った後にオリーブ油からテルブチラジンを抽出する際に使用されてきました。

1. 液液抽出
   - 2 段階の液液抽出を実行するために約 5 g (約 5.5 mL) のオリーブ油試料の一部を、100 mL 分液漏斗内でアセトニトリル飽和石油エーテル 15 mL と混合した。
   - 石油エーテル飽和アセトニトリル溶液 25 mL を、上記の手順で得たオリーブ油混合物に追加する。漏斗を 3 分間よく振って、アセトニトリル相を石油エーテル相から分離採取。
   - 別の石油エーテル飽和アセトニトリル溶液 10 mL を、石油エーテル抽出液に追加する。この混合液を 3 分間振ってアセトニトリル相を採取し、前のステップで得たアセトニトリル相に加えた。
   - 最後に、アセトニトリル抽出液の一部 7 mL を、10 mL ガラス試験管に移した。次に、この抽出液を、約 2 mL の容積にまで慎重に蒸発させた。この残留抽出液はマトリックス固相分散を行うためにガラス乳鉢に移した。

2. MSPD (マトリックス固相分散)
   - 液液抽出工程で得た抽出液を粉末状になるまで、アミノプロピル化学結合型シリカ(Bondesil-NH2、粒径 40µm、Varian Inc.) により均質化 (ホモジナイズ) した。
   - 混合物を、Florisil (12 mL ボンドエルート変形ミニカラム、Varian Inc.) 2 g が入っている市販のミニカラムに移した。このミニカラムを、3 mL/秒の流量に調整した固相抽出法(SPE) 用真空システムに接続した。
   - 5 mL アセトニトリルで、2 回溶出工程を実行した。最後に残った抽出物をほぼ乾燥状態になるまで蒸発し、アセトニトリル：水が 1 ： 1 である溶液に溶かした。
   - LC/ITMS 分析および LC/TOFMS 分析を行う前に、0.45 m PTFE フィルタ(Millex FG、Millipore, Milford, MA, USA) で抽出物を濾過した。

MSPD メソッドを用いると、オリーブ油試料からのテルブチラジン回収率は 96% を越え、相対標準偏差(RSD) は 6 % でした(n = 5)。

Agilent 1100 シリーズ LC/MSD TOF 分析法

LC 条件

LC ポンプは Agilent 1100 シリーズバイナリポンプ

注入量：	50 µL (標準的 Agilent 1100 オートサンプラー)
カラム：	ZORBAX Eclipse XDB-C8、4.6 mm × 150 mm、5 µm、p/n 993967-906
移動相：	A = アセトニトリル
	B = 0.1% ギ酸水溶液
グラジエント：	10 % A で 5 分間保持後、
	0.6 mL/分の流量にて 25 分間で 100% A へリニアグラジエント

MS 条件

LC/MSD TOF

イオン源：	正イオン ESI (エレクトロスプレーイオン化)
キャピラリ電圧：	4000 V
ネブライザー圧力：	40 psig 乾燥ガス流量： 9 L/分
乾燥ガス温度：	300 ℃
フラグメンター：	190 V
スキマー：	60 V
Oct DC1 ：	37.5 V
Oct RF V ：	250 V
リファレンス質量：	*m/z* 121.0509 および 922.0098
分解能：	9500 ± 500 (m/z 922.0098 での場合)
質量範囲：	50 ～ 1000 m/z
リファレンス A スプレーヤー 2 ：	分析中定流量

Agilent 1100 シリーズ LC/MSD トラップ分析法

LC/MSD トラップ

ピークの直接比較のために、LC/MSD TOF 分析条件と同じ

LC ポンプ：	Agilent 1100
注入容積：	50 µL
カラム：	ZORBAX Eclipse XDB-C-8、4.6 mm × 150 mm、5 µm、p/n 993967-906
移動相：	A = アセトニトリル(ACN)
	B = 0.1% ギ酸水溶液
グラジエント：	10 % A で 5 分間保持後、
	0.6 mL/分の流量にて 25 分間で 100% A へ直線的グラジエント

LC/MSD トラップ

ポジティブ ESI :	キャピラリ 3200 V
ネブライザー：	40 psig
乾燥ガス：	9 L/分(ガス温度 300 ℃)
キャピラリ出口：	70 V
スキマー：	60 V

トラップ蓄積： 最大蓄積時間 200 ms 、ターゲット値 50,000 カウント

結果と考察

LC/ITMS および LC/TOFMS によるテルブチラジンの分析

オリーブ油は、フルスキャンモードで発生する多数の妨害成分の存在により、最も厄介な食品マトリックスの 1 つです。その理由により、イオントラップメソッドは、$[M+H]^+$ に対応する *m/z* 230 のみをプリカーサイオンとして単離する MS/MS モードで最適化しました。isolation mass window は *m/z* 2 とし、最適化した fragmentation amplitude 値が S/N 比を増加する目的で使用しました。0.8 V の fragmentation amplitude 値を、tert-ブチル基(-56) の損失で生じる *m/z* 174 のフラグメントイオンが十分生成するために、テルブチラジンに対して使用しました。

図 1 に示すのは、イオントラップ型 MS/MS によるオリーブ油試料(添加量 0.025 mg/kg) の分析結果です。テルブチラジンの主フラグメントである *m/z* 174 の選択反応検出(SRM)クロマトグラムおよびその主ピークの質量スペクトルを示しています。開裂(フラグメンテーション) は、tert-ブチル基の脱離により C-N 結合にて起こります。ｫこの結果から、この対象化合物の特性的開裂が分かり、オリーブ油などの比較的複雑なマトリックス内にあるテルブチラジンの構造確認が可能であることが示されます。

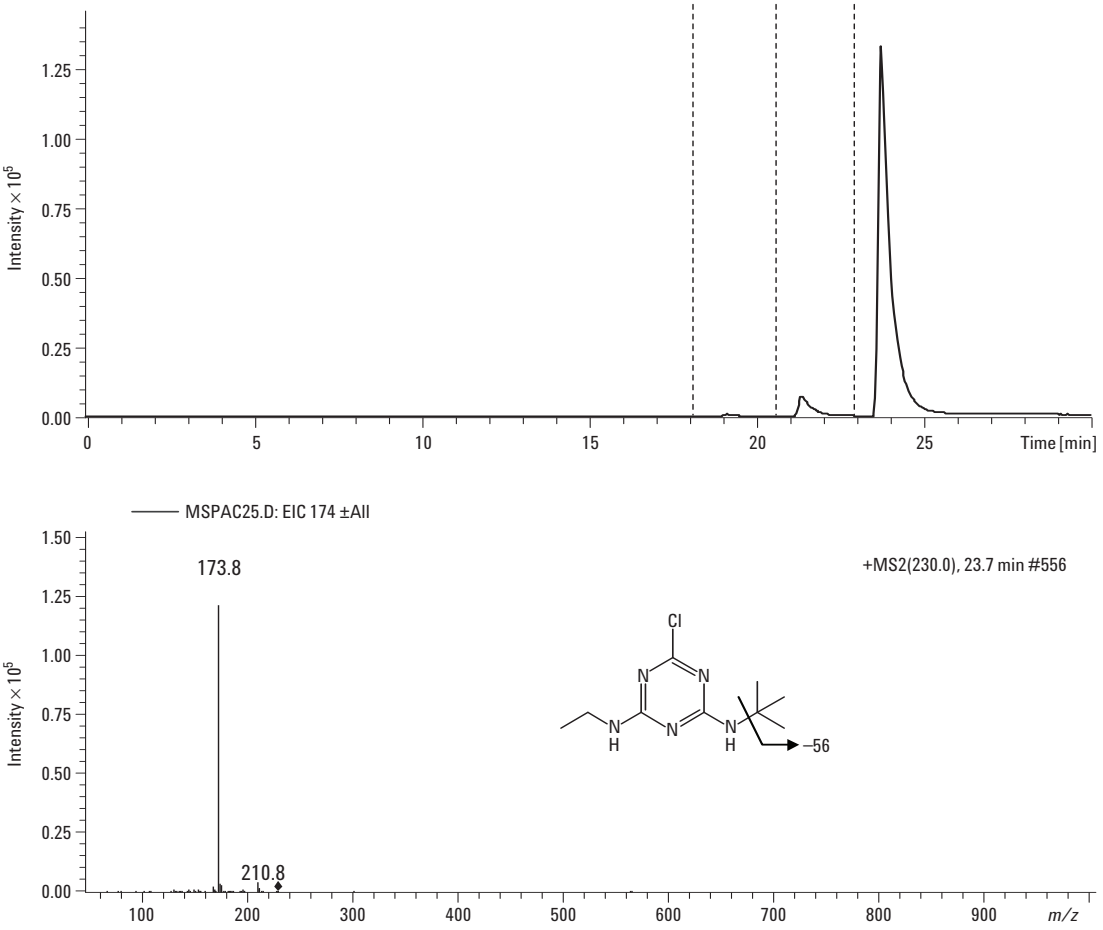

図 1　テルブチラジン添加オリーブ油試料(0.025 mg/kg) の分析結果に対応するイオントラップ型 SRM クロマトグラム。m/z 174 における SRM およびそれに対応する MS/MS スペクトルが示されています。

LC/TOFMS 分析は、開裂の観点より最適化を行いました。インソースの衝突誘起解離(CID) 開裂は、フラグメンター電圧が高いと大幅に増大します。これにより、非常に重要な構造的情報がもたらされます。つまり、特徴的なフラグメントイオンの精密質量を、確認目的で分子イオンの精密質量とともに使用できるためです。テルブチラジンの主フラグメントイオンとプロトン化分子の両方についての相対強度を表 1 にまとめています。電圧は、160 V (低)、190 V (中)、230 V (高) の 3 通りです。(プロトン化分子を使用して) 定量目的に十分な感度、さらにはインソース開裂によって生成されるフラグメントイオンによってなされる定性スペクトル情報を得るために、さらなる分析では 190 V の電圧を用いました。オ添加リーブ油マトリックス中での、テルブチラジンの主フラグメントイオンとプロトン化分子の両方についての精密質量を、表 2 に示します。

表 1　LC/TOFMS において CID 解裂に及ぼされるフラグメンター電圧の影響

m/z イオン	相対強度		
	160 V	190 V	230 V
230 $[M+H]^+$	100	100	20
174 $[M+H-C_4H_8]^+$	5	30	100

表 2　オリーブ油マトリックス添加標準試料におけるテルブチラジンおよびその主フラグメントイオンの LC/TOFMS 精密質量測定値：添加量 0.025 mg/Kg

元素組成	イオン	理論質量	実測質量	誤差	
				mDa	ppm
$C_9H_{16}N_5{}^{35}Cl$	$[M+H]^+$	230.1167	230.1168	0.1	0.4
$C_9H_{16}N_5{}^{37}Cl$		232.1137	232.1134	–0.3	–1.5
$C_5H_9N_5{}^{35}Cl$	$[M+H–C_4H_8]^+$	174.0541	174.0542	0.1	0.6
$C_5H_9N_5{}^{37}Cl$		176.0511	176.0511	–0.05	–0.3

テルブチラジンでは、プロトン化分子の精密質量、および最適化されたインソース開裂によって得たフラグメントイオンによってもたらされる情報とともに、塩素原子の存在といったテルブチラジンの同定を可能にするための別の特徴も示されます。^{37}Cl 同位体シグナルの精密質量パターンにより、ピークには塩素 1 原子が含まれていることが明白に確認できます(図 2)。そのため、各イオンの精密質量、塩素シグナルの存在は、特性的な保持時間とともに、このような複雑なマトリックス内でも試料を明白に同定、確認できるだけの十分な情報であることが示されます。

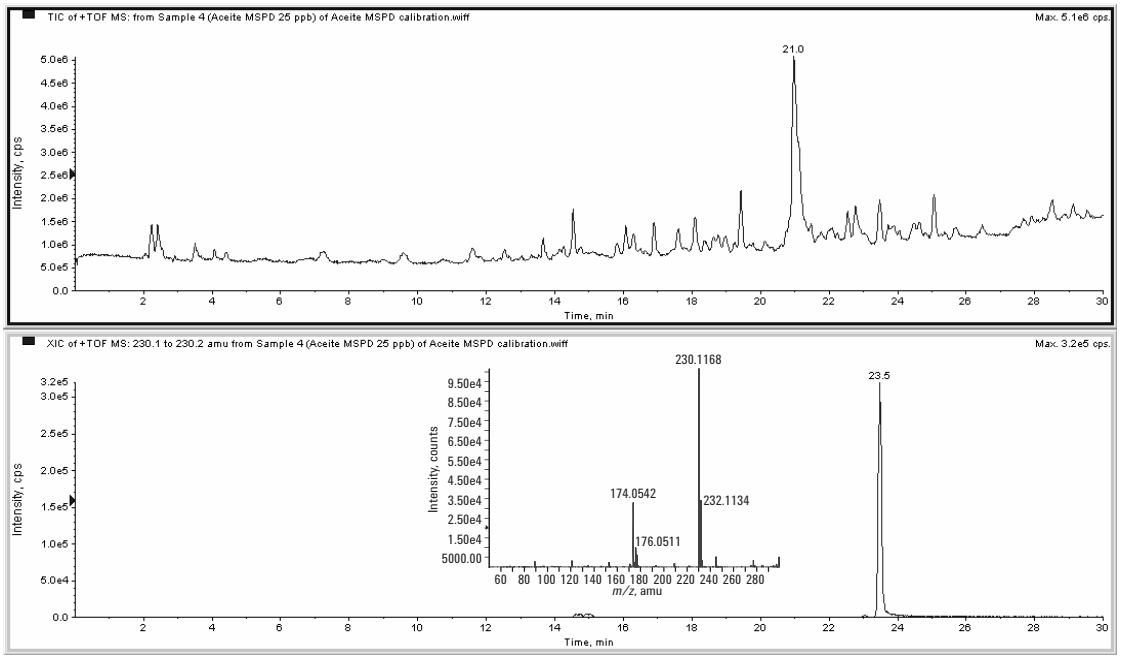

図 2　テルブチラジン添加オリーブ油試料(0.025 mg/kg) の分析結果に対応する LC/TOFMS の全イオンクロマトグラム(TIC). m/z 230 の EIC、およびそのピークの質量スペクトルも示しています。

分析性能

今回のメソッドの分析性能を検討した目的は、脂肪含有量が高い複雑なマトリックス中テルブチラジンの定量分析能力を調査することです。キャリブレーションは、実験方法の項で記してある MSPD による抽出法で調製したマトリックス添加標準試料を使用して行いました。直線性の評価は、マトリックス添加標準試料溶液を用い、

0.005 ～ 0.5 mg/kg の範囲内で 7 とおりの濃度で行いました。イオントラップによる定量は、*m/z* 230 イオンの MS/MS モードで行いました。LC/TOFMS による定量は、0.1 Da の質量ウィンドウでプロトン化分子の EIC からのピーク面積を使用して行いました。例として図 3 では、オリーブ油マトリックス中テルブチラジンについて LC/TOFMS によって得られた直線的な検量線を、純溶媒から得た検量線と比較しながら示します。

検出限界(LOD) の概算は、S/N 比が約 3 である濃度レベルのマトリックス添加標準試料を注入することで行いました。その結果を表 3 に示します。算出された LOD は、当該の最大残留量に関する規制より大幅に低く、注目すべきものとなりました。その意味で LC/TOFMS 分析は、S/N 比を増加させる幅の狭い質量ウィンドウを定量目的で使用することに意義があり、検出限界を低くすることができます。この結果は、脂肪含有量が高い複雑なマトリックス中の農薬の分析について、MSPD および LC/TOFMS に基づいた今回の方法の分析能力としての可能性を示しています。

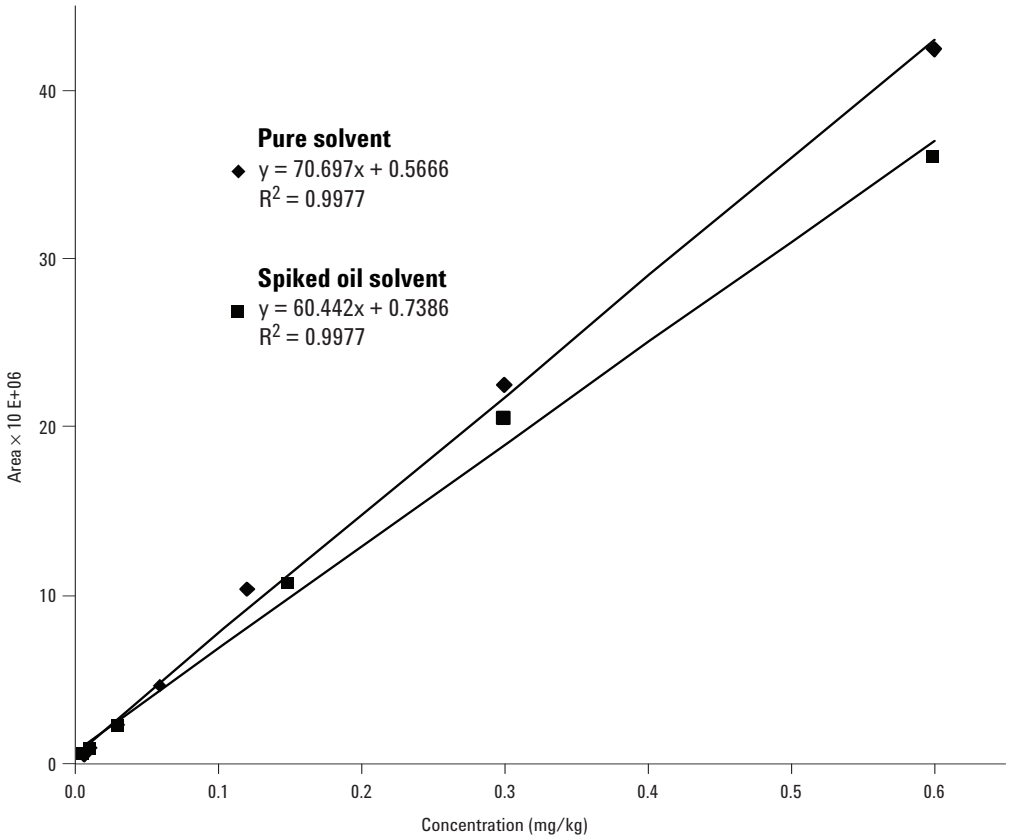

図 3 LC/TOFMS を使用した場合における添加オリーブ油試料と溶媒試料との検量線比較

表 3　イオントラップ型 MS/MS および LC/TOFMS を用いたオリーブ油試料中テルブチラジンの分析に関する分析性能

方法	濃度範囲 range (mg/kg)	直線性 (R^2)	LOD (µg/kg)	RSD(%) n = 5
LC/ITMS	0.005–0.5	0.991	0.2	5.5
LC/TOFMS	0.005–0.5	0.995	1	2

オリーブ油試料の分析

今回の方法の有効性評価には、オリーブ油試料の分析を用いました。図 4 に、オリーブ油試料中に微量のテルブチラジンが検出された例、および *m/z* 230 での EIC を示します。この例は、特にオリーブ油など複雑なサンプル中の微量農薬を分析する際に、LC/TOFMS の定期的な精密質量測定能力が有用性であることを実際に示すものです。その意味で、LC/TOFMS の選択性は *m/z* 軸に対する装置の分解能に頼っており、質量差異が 0.05 Da 以内で目的物質と同重イオンによる妨害(たとえば 230 *m/z*)の識別を可能にしています。テルブチラジンの場合では、同重イオンによる妨害は塩素同位体シグナル、または他の妨害物質に影響されない特徴的なフラグメントを使用することで容易に克服できます。

結論

LC/ITMS および LC/TOFMS は、事前的なサンプル処理をいくつか行った後、オリーブ油試料中のテルブチラジンの同定、定量を行うことが可能です。イオントラップによる分析は、*m/z* 174 で特徴的なフラグメントイオンをモニタリングする MS/MS モードで行いました。LC/TOFMS による同定は、プロトン化分子($[M+H]^+$ *m/z* 230) の精密質量(およびその後計算される実験式)を、テルブチラジンのフラグメントイオンおよび特徴的な塩素同位体クラスターの精密質量とともに使用して行いました。このときに得られた一般的な精度は、通常的に 2 ppm 以内となりました。この方法の感度、直線性、正確さ、精度、マトリックス効果、および検出限界 (LOD) についても検討を行い、オリーブ油中テルブチラジンの定期的定量分析としての LC/TOFMS および LC/ITMS の可能性を支持する結果となりました。

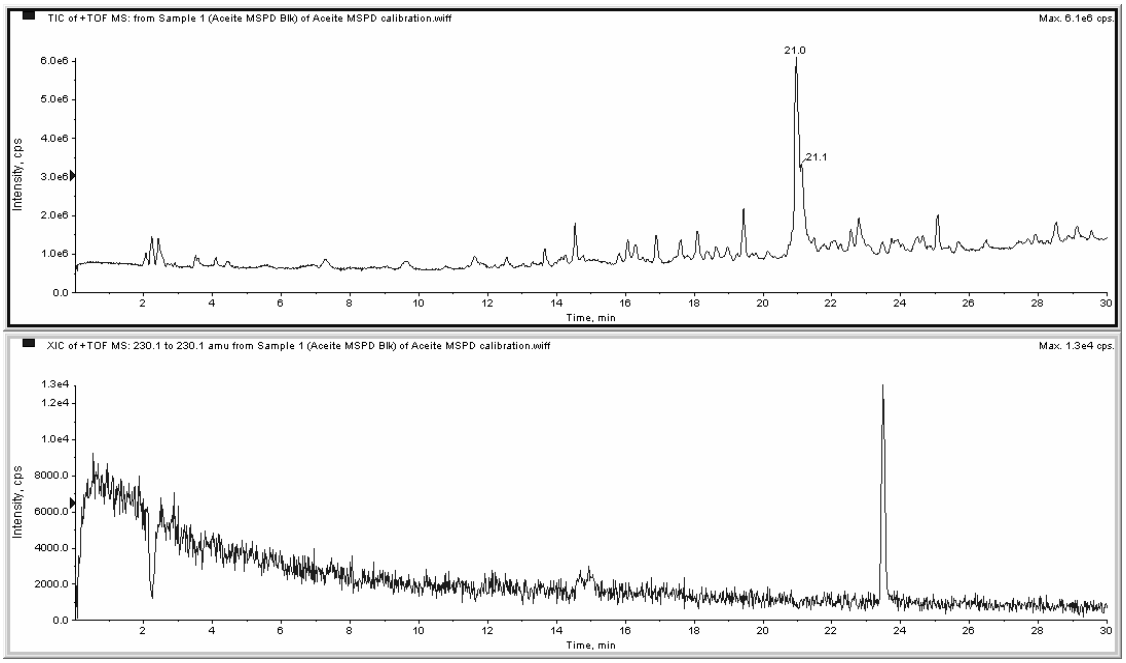

図 4　(上)：オリーブ油試料中テルブチラジンの“存在を示す”LC/TOFMS の全イオンクロマトグラム(TIC)。
(下)：20 mDa 質量ウィンドウを使用したテルブチラジンの抽出イオンクロマトグラム(EIC)

参照文献

1. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin, COM/2003/0117/final – COD2003/0052*/; www.europa.eu.int/pol/food/indexes.htm
2. Ch. Lentza-Rizos, E. J. Avramides, and F. Cherasco, (2001) *J. Chromatogr*. A **912**: 135–142.
3. J. J. Vreuls, R. J .J. Swen, V. P. Goudriaan, M. A. T. Kerkhoff, G. A. Jongenotter, and U. A. Th. Brinkman, (1996) *J. Chromatogr*. A **750**: 275–286.
4. C. Ferrer, M. J. Gómez, J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, and A. R. Fernández-Alba, (2005) *J. Chromatogr*. A **1069**: 183–194.

謝辞

Amadeo Fernandez-Alba、Juan-Francisco García-Reyes、および Carmen Ferrer (Depar tment of Hydrogeology and Analytical Chemistry, University of Almería) に対し、支援、意見、および分析的な支持をくださったことに感謝いたします。

Agilent contact: Jerry Zweigenbaum

詳細情報

弊社の製品およびサービスに関する詳細情報は、**www.agilent.com/chem** をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒 192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in Japan
August 23, 2005
5989-3573JAJP

Agilent Technologies